

ผลของรังสีแกมมาต่อการทำลายสารแอฟลาท็อกซินในถั่วลิสง

Effects of Gamma-Ray on the Destruction of Aflatoxin in Peanut

สุชาดา วรกิจ¹ และ ทนง ภัคทรัพย์พันธุ์²

Suchada Worakit and Thanong Pukrushpan

ABSTRACT

Effect of gamma-ray on the destruction of aflatoxin in peanut were studied. Forty peanut samples available in the market from different parts of the country were inoculated with *A. flavus*. After incubation at room temperature for a certain period of time, the inoculated peanut samples were irradiated with 6.4 kGy dose. The concentration of aflatoxin B₁ in irradiated and non irradiated samples were determined. It was found that there was no significant differences on the average concentration of aflatoxin B₁ between irradiated and non-irradiated samples. Furthermore, the concentration of aflatoxin B₁ in 22 out of 40 peanut samples (55%) were varied from 0 to 4834 ppb and mostly (42.5%) found above the level of the standard value. Maximum microbial load and aflatoxin concentration were found on 9 day of incubation, approximately 1.04×10^{10} colonies and 1200 ppb respectively.

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการทำลายแอฟลาท็อกซินในถั่วลิสง โดยทำการตรวจสอบสารแอฟลาท็อกซินในตัวอย่างถั่วลิสงที่เก็บจากตลาดในส่วนต่าง ๆ ของประเทศจำนวน 40 ตัวอย่าง ก่อนและหลังการฉายรังสี 6.4 กิโลเกรย์. ทำการเติมเชื้อ *A. flavus* ลงในถั่วที่ปลอดเชื้อด้วยรังสี แล้วบ่มไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน จากนั้นนำไปฉายรังสีขนาด 6.4 กิโลเกรย์ แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอฟลาท็อกซิน B₁ ผลปรากฏว่าสามารถตรวจพบสารแอฟลาท็อกซิน B₁ ในตัวอย่างถั่วลิสงถึง 22 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 55 พบปริมาณตั้งแต่ 0-4834 ส่วนในพันล้านส่วน ในจำนวนนี้มีปริมาณเกินกว่าระดับมาตรฐานถึง 17 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 42.5 เมื่อเปรียบเทียบ

ส่วนที่ไม่ฉายรังสีและฉายรังสี ถึงแม้จะมีค่าเฉลี่ยเป็น 550.9 และ 109 พีพีบี ตามลำดับ ก็ตามแต่ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ และการเติมเชื้อ *A. flavus* ลงในถั่วแล้วเก็บไว้เป็นระยะ ๆ หลังจากฉายรังสีแล้วพบว่าก่อนการฉายรังสีจะได้ปริมาณเชื้อสูงสุด เมื่ออายุ 9 วัน คือ 1.04×10^{10} โคโลนี และมีปริมาณแอฟลาท็อกซินสูงสุดเช่นเดียวกัน คือ 1,100 และ 1,200 พีพีบี สำหรับส่วนที่ไม่ฉายและฉายรังสี ตามลำดับ

คำนำ

ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) เป็นพืชตระกูลถั่วที่มีอายุการเก็บเกี่ยวสั้น สามารถปลูกได้ทุกภาคและราคาถูก ยิ่งไปกว่านั้น ถั่วลิสงยังให้คุณค่าอาหารประเภทโปรตีนสูง ใช้ทำน้ำมันบริโภค และนิยมใช้

1 สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการพลังงาน

2 ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart Univ.

ประกอบอาหารอื่น ๆ จึงนับได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมาก การบริโภคถั่วลิสงในรูปต่าง ๆ กันของมนุษย์ ตลอดจนการนำไปใช้เพื่อเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ กำลังประสบปัญหาเกี่ยวกับสารพิษที่เกิดจากเชื้อราที่มีชื่อว่าแอฟลาท็อกซิน สารพิษชนิดนี้เป็นสารพิษที่เชื้อรา *Aspergillus flavus* สร้างขึ้นในเมล็ดพืชขณะที่เชื้อราเจริญเติบโต สารพิษชนิดนี้เป็นสารพิษที่มีฤทธิ์ร้ายแรงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารพิษชนิดอื่น ๆ ปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าสารพิษดังกล่าวเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งในตับ จากการศึกษพบว่าถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์ถั่วลิสงในเมืองไทยนั้นมีสารพิษชนิดนี้ปะปนอยู่มากกว่าผลิตภัณฑ์อื่น ๆ (Shank and Wogan, 1972)

แอฟลาท็อกซินสามารถทนต่อความร้อนสูงถึง 260 องศาเซลเซียส (ศรีสิทธิ์, 2515) ดังนั้นการทำลายแอฟลาท็อกซินที่ปะปนอยู่ในอาหารโดยความร้อนจึงมีอาจกระทำได้ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณความร้อนดังกล่าวย่อมทำลายคุณภาพของอาหารโดยสิ้นเชิง รังสีไอออนไนส์ เช่น รังสีแกมมา มีอำนาจในการทะลุทะลวงได้ดี ปัจจุบันรังสีชนิดนี้ได้ถูกนำมาใช้ในการถนอมอาหารอย่างแพร่หลาย และรังสีชนิดนี้ไม่มีผลทำให้คุณค่าอาหารเปลี่ยนแปลง รายงานในประเทศไทยยังไม่เคยปรากฏในการศึกษาถึงผลของรังสีแกมมาต่อการทำลายแอฟลาท็อกซินแต่อย่างใด ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการทำลายแอฟลาท็อกซินในถั่วลิสง

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างถั่วลิสงแห้งกะเทาะเปลือกจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคใต้ และภาคเหนือ รวม 40 ตัวอย่าง และเชื้อ *A. flavus* 11 isolates จากสาขาโรคพืชผลิตผลการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

1. ผลของรังสีต่อแอฟลาท็อกซินในถั่วลิสงจากท้องตลาด

สุ่มตัวอย่างถั่วลิสงจากร้านค้าจากจังหวัดต่าง ๆ รวม 40 ตัวอย่าง โดยเลือกซื้อตัวอย่างที่วางจำหน่าย

ในร้านค้า โดยสุ่มจากจุดต่าง ๆ ของภาชนะบรรจุจนได้น้ำหนักประมาณ 500 กรัม จากนั้นแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน เก็บแต่ละส่วนบรรจุในถุงพอลิเอทิลีน ต่อจากนั้นจึงนำไปฉายรังสีขนาด 0 และ 6.4 กิโลเกรย์

การวิเคราะห์หาแอฟลาท็อกซิน

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอฟลาท็อกซินจากตัวอย่างที่ฉายรังสีและไม่ฉายรังสี โดยวิธีการที่ได้ปรับปรุงมาจากวิธี Best food ตามวิธีของ AOAC (1980)

2. ผลของรังสีต่อการทำลายแอฟลาท็อกซินในถั่วลิสงที่เติมเชื้อ *A. flavus* เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องระยะเวลาต่าง ๆ กัน

การเตรียม inoculum โดยการเลี้ยงเชื้อ *A. flavus* isolate ที่มีความต้านทานต่อรังสีมากที่สุด (จากจำนวน 11 isolates ซึ่งแยกได้จากถั่วลิสง) บน potato dextrose agar (PDA) slant ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5-7 วัน ล้างสปอร์ออกจากผิวหน้าของอาหารด้วยส่วนผสมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์ pH 7) และ Tween 80 ร้อยละ 0.05 นำไปกรองผ่านผ้าขาวบางปราศจากเชื้อหนาหลาย ๆ ชั้นเพื่อขจัดเส้นใย ปรับความเข้มข้นของส่วนที่กรองได้ให้มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น 20-30 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยการตรวจนับด้วย Petroff-Housser counting chamber

การเตรียมตัวอย่าง

นำถั่วลิสงที่มีลักษณะปรากฏดี คัดเอาแต่เมล็ดที่สมบูรณ์ บรรจุในถุงพอลิเอทิลีน นำไปฉายรังสีขนาด 45 กิโลเกรย์เพื่อทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ปะปนอยู่ (WHO, 1981) แบ่งตัวอย่างถั่วลิสงหนัก 100 กรัม ใส่ลงพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร เติม inoculum ที่เตรียมได้ลงไป 3 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 7 มิลลิลิตร โดยจะทำการเติมลงไปในตัวอย่งที่ละน้อย พร้อมทั้งทำการเขย่าเป็นระยะ ๆ ทั้งนี้เพื่อให้สปอร์มีการกระจายตัวอย่างทั่วถึง เขย่าต่อไปเป็นระยะ ๆ นานประมาณครึ่งชั่วโมง ทำการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีดังกล่าวนี้หลาย ๆ ครั้ง จนได้ถั่วลิสงหนักประมาณ 2,000 กรัม แล้วผสมให้เข้ากันดี ต่อจากนั้นจึงแบ่ง

ตัวอย่างถั่วลิสงหนักประมาณ 150 กรัม ใส่ลงในพลาสติก ขนาด 500 มิลลิตร จำนวน 6 ฟลอสก์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 4 องศาเซลเซียส) นานเป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12 และ 17 วัน ตามลำดับ ต่อจากนั้นจึงนำตัวอย่าง ที่ระยะเวลาการบ่มต่าง ๆ กันมาแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน บรรจุในถุงพอลิเอทิลีน แล้วนำไปฉายรังสี 0 และ 6.4 กิโลเกรย์ แต่ละการทดลองมี 3 ซ้ำ

ผลและวิจารณ์

1. ผลของรังสีต่อการทำลายแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงจากท้องตลาด
- ในการศึกษาผลของรังสีต่อการทำลายแอฟลาทอกซินจากตัวอย่างถั่วลิสงจากท้องตลาด

Table 1 Comparison of aflatoxin content in peanut found in local market and after irradiated with 6.4 KGray.

Location (Provinces)	Number of sample		Aflatoxin B ₁ (ppb)	
	Total	% Found	Non Irradiated	Irradiated
Bangkok	4	25.0	20.6	18.7
Saraburi	3	66.7	14.6	53.1
			403.8	24.0
Singhburi	3	33.3	1261.0	85.6
Angtong	3	33.3	16.0	7.6
Nontaburi	3	66.7	200.2	111.7
			40.9	115.5
Nakornsawan	2	100.0	79.7	0
			14.1	135.9
Petchburi	2	50.0	31.6	15.5
Samutsakorn	3	0	0	—
Nakornnayok	2	50.0	44.6	39.5
Cholburi	2	0	0	—
Rayong	2	100.0	9.9	11.8
			139.5	783.0
Chiangmai	2	50.0	22.5	10.1
			1817.5	—
Lumpoon	1	100.0	105.0	83.3
Pisanulok	3	66.7	1427.4	251.7
			51.4	44.1
Puket	3	66.7	13.7	0
			3003.4	323.0
Pang Nga	2	100.0	4834.1	69.9
			34.3	108.8

ในภาคต่าง ๆ เปรียบเทียบถั่วลิสงที่ไม่ผ่านการฉายรังสี ปรากฏว่าถั่วลิสงจากจังหวัดต่าง ๆ มีปริมาณการปนเปื้อนของแอฟลาท็อกซิน B_1 ต่าง ๆ กัน ปริมาณแอฟลาท็อกซิน B_1 ที่ตรวจพบสูงสุด คือ 4834.09 พีพีบี เป็นตัวอย่างที่ได้จากจังหวัดพังงา รองลงมาได้แก่ตัวอย่างถั่วลิสงที่พบในจังหวัดภูเก็ต ปริมาณแอฟลาท็อกซินที่ประเทศไทยอนุญาตให้มีได้ในอาหารมีค่าเพียง 20 พีพีบี (ส่วนใหญ่พื้นล้านส่วน) จะเห็นได้ว่า (ตารางที่ 1) ตัวอย่างถั่วลิสงส่วนใหญ่ที่ทำการศึกษามีระดับการปนเปื้อนของสารพิษชนิดนี้อยู่ในเกณฑ์ที่สูงกว่าระดับมาตรฐาน

ภายหลังการฉายรังสี 6.4 กิโลเกรย์ ปริมาณแอฟลาท็อกซิน B_1 ที่ตรวจพบในตัวอย่างที่ฉายและไม่ฉายรังสีจะมีค่าเปลี่ยนแปลงไปอย่างไม่เป็นระเบียบ กล่าวคือ บางตัวอย่างจะมีปริมาณสารพิษสูงขึ้น ส่วนบางตัวอย่างจะลดลง (ตารางที่ 1) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากธรรมชาติของตัวอย่างถั่วลิสงเองซึ่งมีการกระจายตัวสูงมาก การที่บางเมล็ดมีเชื้อราซึ่งสามารถสร้างแอฟลาท็อกซินปนเปื้อนอยู่เพียง 1 เมล็ด ในตัวอย่าง 200 เมล็ด (หรือ 100 กรัม) จะสามารถตรวจพบแอฟลาท็อกซินถึง 40–145 พีพีบี (Kiermeier, 1978) ฉะนั้น การเตรียมตัวอย่างเพื่อให้สม่ำเสมอขึ้นกระทำได้ยากมาก นอกจากนั้น ปริมาณแอฟลาท็อกซินที่ตรวจพบบนเมล็ดถั่วลิสงนั้น ๆ อาจมีปริมาณไม่เท่ากันอีกด้วย ดังนั้น แม้ว่าจะทำการสุ่มตัวอย่างอย่างดีที่สุดแล้วก็ตาม แต่ยังไม่สามารถควบคุมให้ระดับของแอฟลาท็อกซินในตัวอย่างหนึ่ง ๆ ซึ่งถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ฉายและไม่ฉายรังสีมีปริมาณแอฟลาท็อกซินเท่ากันก่อนได้ จึงอาจทำให้ส่วนของตัวอย่างที่จะถูกนำไปฉายรังสีมีปริมาณของแอฟลาท็อกซินสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ฉายรังสี หรือในทางกลับกัน ดังนั้น ผลที่ได้จึงทำให้ปริมาณของแอฟลาท็อกซินแตกต่างกันไปอย่างไม่เป็นระเบียบ อย่างไรก็ตาม ค่าเฉลี่ยของแอฟลาท็อกซินในส่วนที่ไม่ได้ฉายรังสี คือ 550.9 พีพีบี ซึ่งสูงกว่าจากถั่วที่ฉายรังสี คือ 109 พีพีบี ถึงแม้ว่าการเปรียบเทียบทางสถิติ (t-test) ไม่พบความแตกต่างก็ตาม

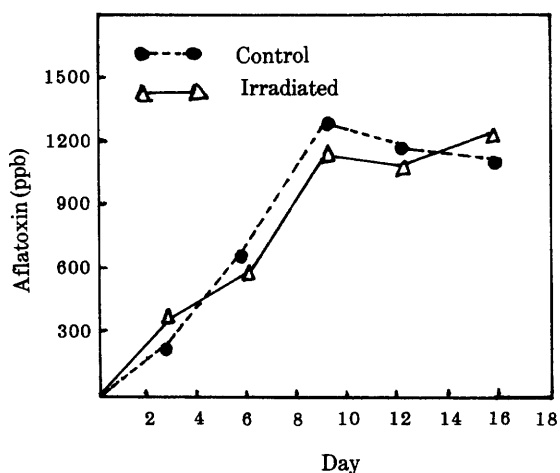


Figure 1. Effect of 6.4 KGy irradiation on Aflatoxin content in *A. flavus* inoculated peanut incubated at room temperature ($28 \pm 4^\circ\text{C}$)

2. ผลของรังสีต่อการทำลายแอฟลาท็อกซินในถั่วลิสงที่ใส่เชื้อ *A. flavus* เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

จากการศึกษาผลของรังสีต่อการทำลายแอฟลาท็อกซินในถั่วลิสงที่ใส่สปอร์ของเชื้อ *A. flavus* เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 4 องศาเซลเซียส) ที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 3, 6, 9, 12 และ 17 วัน จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ กันนั้นไปฉายรังสีขนาด 0 และ 6.4 กิโลเกรย์ จากการตรวจหาปริมาณแอฟลาท็อกซินก่อนและหลังการฉายรังสี พบว่าปริมาณแอฟลาท็อกซิน B_1 จะถูกสร้างขึ้นในปริมาณสูงสุดภายหลังการเลี้ยงเชื้อนาน 9 วัน และหลังจากนั้นจะลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 1) จากการตรวจหาปริมาณของเชื้อราที่เจริญเติบโตบนถั่วลิสงพบว่า เชื้อราจะมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 9 เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 2) หลังจากนั้นปริมาณของเชื้อราจะลดลงเล็กน้อย อันเป็นผลจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม จากการสังเกตพบว่า ปริมาณความชื้นในเมล็ดถั่วลิสงจะลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ สาเหตุอันเนื่องมาจากการลดลงของปริมาณเชื้อดังกล่าว อาจมีผลทำให้ปริมาณของแอฟลาท็อกซินลดลงตามไปด้วย นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า เชื้อ *A. flavus*

Table 2 Comparison of *A. flavus* content found in non irradiated and 6.4 KGy irradiated peanuts incubated at room temperature

Incubation time (day)	Colony/gm	
	Nonirradiated	Irradiated
0	0.33	0
3	9.30×10^5	0
6	5.31×10^8	0
9	1.04×10^{10}	0
12	5.73×10^9	0
17	1.41×10^9	0

จะสร้างสารพิษได้มากที่สุดภายหลังจากได้เลี้ยงเชื้อไว้ 5-9 วัน (Davis *et al.*, 1966; Schroeder, 1966) แล้วแอฟลาท็อกซินจะลดลง

สำหรับปริมาณแอฟลาท็อกซินที่ตรวจพบในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ เป็นแอฟลาท็อกซินที่มีอยู่ในถั่วลิสงก่อนการทดลอง ส่วนปริมาณแอฟลาท็อกซินที่ตรวจพบก่อนและหลังการฉายรังสีที่ช่วง

Table 3 Statistical Analysis—Effect of irradiation on aflatoxin content in storage peanut

SOV	DF	MS	F
Reps	2	12440.88	0.5091
Treatment	11	641687.84	26.26
Dose	1	2.28	0.00009
Incubation period	5	1045365.25	57.52**
Error	22	24432.71	

ระยะเวลาต่าง ๆ ของการทดลองจะมีปริมาณใกล้เคียงกัน แม้ว่าปริมาณแอฟลาท็อกซิน B_1 ที่ตรวจพบภายหลังฉายรังสีในบางตัวอย่างจะมีปริมาณสูงกว่าปริมาณที่ตรวจพบก่อนฉายรังสี แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงจะอยู่ในขอบเขตที่แคบกว่า ทั้งนี้เพราะในการทดลองได้มีการเติมเชื้อ *A. flavus* ลงในตัวอย่างถั่วลิสง ทำให้ถั่วลิสงทุกเมล็ดมีเชื้อราเจริญเติบโตอยู่ ซึ่งจะทำให้มีแอฟลาท็อกซินเกิดปะปนอยู่ด้วย ดังนั้น จึงสามารถควบคุมปริมาณแอฟลาท็อกซินในตัวอย่างก่อนและหลังฉายรังสีให้อยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันได้

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณแอฟลาท็อกซินก่อนและหลังฉายรังสีจะไม่มี ความแตกต่างกันในทางสถิติ (ตารางที่ 3) นั่นคือ รังสีขนาด 6.4 กิโลเกรย์ ไม่มีผลต่อปริมาณแอฟลาท็อกซินแต่อย่างใด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Frank and Grunewald. (1970) ซึ่งได้รายงานว่ารังสีขนาด 3 เมกกะแรด ไม่มีผลต่อการทำลายแอฟลาท็อกซิน นอกจากนั้น รังสียังไม่มีผลต่อการลดความเป็นพิษของแอฟลาท็อกซินอีกด้วย

สรุป

จากการศึกษาปริมาณแอฟลาท็อกซินในตัวอย่างถั่วลิสงและผลของการฉายรังสีนั้น พอสรุปได้ดังนี้ คือ

1. ปริมาณแอฟลาท็อกซินที่ตรวจพบในถั่วลิสงต่าง ๆ 40 ตัวอย่าง มีค่าตั้งแต่ 0-4834 ส่วนในพันล้านส่วน (พีพีบี) จำนวน 17 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 42.5 มีค่าสูงกว่าระดับมาตรฐาน

2. การฉายรังสีขนาด 6.4 กิโลเกรย์ ไม่ได้ทำให้สารพิษลดลงแต่อย่างใด ทั้งในตัวอย่างที่เดิมและไม่เติมเชื้อ *A. flavus*

3. การเติมเชื้อ *A. flavus* ลงไปในถั่วลิสงปลอดเชื้อจะได้ปริมาณสารพิษและปริมาณเชื้อสูงสุดเมื่ออายุได้ 9 วัน คือ 1200 พีพีบี และ 1.04×10^{10} โคโลนี ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- ศรีสิทธิ์ การุณขนิช. 2515. สารแอฟลาท็อกซินจากเชื้อราบางชนิด. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 14: 37-58
- AOAC, 1980. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Davis, N.P., U.L. Dione and D.W. Eldridge. 1966. Production of aflatoxin B₁ and G₁ by *Aspergillus flavus* in semisynthetic medium. Appl. Microbiol. 14: 378-380.
- Frank, H.K. and T.H. Grunewald. 1970. Radiation resistance of aflatoxins. Paper presented at the FAO/IAEA Research Coordination Meeting on Microbiology Aspect of Food Irradiation on Vienna. 12 May 1970. pp. 15-20.
- Kiermeier, F. 1978. Einfubrung in die Myko-toxin-Problemalik. Lebensmittels Untersuchung and-Forschung. 167: 115-127.
- Miyaki, K., K. Aibara and T. Miure. 1967. Resistance of aflatoxin to chemical and biological changes by gamma irradiation, pp. 57-64. In Proceedings of a Panel-Vienna June 27-July 1.
- Shank, R. C. and C.N. Wogan. 1972. Dietary aflatoxins and human liver cancer II. Aflatoxins in market foods and food-stuffs of Thailand and Hong Kong. Fd. Cosmet. Toxicol. 10: 61-69.
- Schroeder, H.W. 1966. Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parositicus*. App. Microbiol. 14: 381-383.